

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-090756

(43)Date of publication of application : 05.04.1994

(51)Int.CI.

C12N 15/10
C12N 15/11
C12Q 1/68

(21)Application number : 04-241798

(71)Applicant : FUSO YAKUHIN KOGYO KK

(22)Date of filing : 10.09.1992

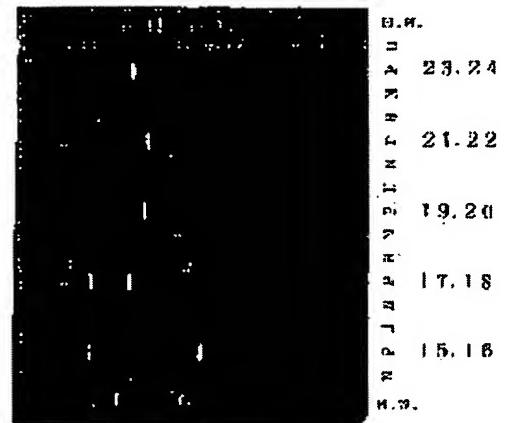
(72)Inventor : KAMIYAMA HIROSHI
FUKUDA KANAKO
MATSUHISA AKIO

(54) TWO STAGE THERMOCYCLE PCR METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a PCR method more simple and accurate than the conventional method.

CONSTITUTION: In the first stage, a sample containing a target sequence-containing double stranded DNA is subjected to a reaction for denaturating the above DNA at a temperature generally used for denaturation of a DNA in the conventional PCR method. In the second stage, in the presence of normal- and reverse-direction primers respectively having of a length of ≥ 35 bases, four kinds of bases dGTP, dATP, dTTP and dCTP and DNA polymerase, an annealing reaction between both the primers for the above denatured DNA containing the target sequence and an elongation reaction of the primer chain by DNA polymerase are carried out at a temperature generally used for elongation of a primer chain in the conventional PCR method. This two stage thermocycle PCR method is thus characteristic.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 23.06.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 18.12.2001

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2002-00946

[Date of requesting appeal against examiner's 17.01.2002]

This Page Blank (uspto)

[decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

This Page Blank (uspto)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90756

(43)公開日 平成6年(1994)4月5日

(51)Int.Cl.⁵
C 12 N 15/10
15/11

C 12 Q 1/68

識別記号 ZNA
Z 7823-4B
8931-4B

F I

C 12 N 15/ 00

技術表示箇所

A

審査請求 未請求 請求項の数 5(全 12 頁)

(21)出願番号 特願平4-241798

(22)出願日 平成4年(1992)9月10日

(71)出願人 000238201

扶桑薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

(72)発明者 上山 浩

大阪府大阪市城東区森之宮2-9-1412

(72)発明者 福田 加奈子

京都府八幡市橋本東山本19-37

(72)発明者 松久 明生

奈良県奈良市右京2-1-2-32-504

(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外1名)

(54)【発明の名称】 2段サーモサイクルPCR法

(57)【要約】

【目的】 従来法より簡単、正確なPCR法を提供すること。

【構成】 第1段として、標的配列含有2本鎖DNAを含む試料中の上記DNAの変性反応を、PCR法においてDNAの変性に通常用いられる温度で行い、第2段として、それぞれ35塩基以上の長さをもつ正方向および逆方向プライマー、4種の塩基dGTP、dTATP、dTTP、dCTPおよびDNAポリメラーゼの存在下に、上記標的配列を含む変性DNAに対する両プライマーのアニーリング反応とDNAポリメラーゼによるプライマー鎖の伸長反応を、PCR法においてプライマー鎖の伸長反応に通常用いられる温度で行うことを特徴とする、2段サーモサイクルPCR法。

プライマー：配列番号



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 第1段として、標的配列含有2本鎖DNAを含む試料中の上記DNAの変性反応を、PCR法においてDNAの変性に通常用いられる温度で行い、第2段として、それぞれ35塩基以上の長さをもつ正方向および逆方向プライマー、4種の塩基dGTP、dTATP、dTTP、dCTPおよびDNAポリメラーゼの存在下に、上記標的配列を含む変性DNAに対する両プライマーのアニーリング反応とDNAポリメラーゼによるプライマー鎖の伸長反応を、PCR法においてプライマーチェーンの伸長反応に通常用いられる温度で行うことを特徴とする、2段サーモサイクルPCR法。

2

【請求項2】 下記配列から選ばれた塩基配列を有する化合物。

【化1】

[配列番号:1] 5'- ATTCTGTGTCGCGTGCCTCATGCCATGTGCAACAATGATA -3'
 [配列番号:2] 5'- GCGGATTTAGGTGTGATCATGCCAAAGTATTGATAACCCG -3'
 [配列番号:3] 5'- GGTTGGCCTAATATTGTTCTGCAAACCCGCTGGGTATCA -3'
 [配列番号:4] 5'- GCGAGTTACTTTAGGTACATCTGCAAGATTGCGATCCGTGG -3'
 [配列番号:5] 5'- GGATTTGTCGAAACCACAGACAAAGGATAGCCGAAA -3'
 [配列番号:6] 5'- CATCTCTATGCAATTCAAAGGGGGCTTAACAAAGGCATTG -3'
 [配列番号:7] 5'- TCATGGTGCAAATGGATGGATGAGGCCACGGCTTCTGGT -3'
 [配列番号:8] 5'- GATCACGGTTCGGTAAATTGAGGTACAGATGGCTTTTCGA -3'
 [配列番号:9] 5'- TTAGAAAGCCGACCCATTGGGGGTTGACACATCTGTAC -3'
 [配列番号:10] 5'- GAGCCCTGACCTAGTAATGCAACAATTCTGCACCCACCT -3'
 [配列番号:11] 5'- AGTGGTATTAGGGATGGGTATTGCAACCCCTGTTGTTCTG -3'
 [配列番号:12] 5'- CTCGAGGCATCAAATGATACTCTATCAGCAGTAGTGG -3'

【請求項3】 請求項2記載の化合物からなるプライマー。

【請求項4】 請求項3記載のプライマーを用いたPCR反応で得られる增幅生産物であるヌクレオチド。

【請求項5】 請求項1記載のPCR反応を実施し、増幅生産物を検索することを特徴とする、核酸検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法の変則法による感染症の診断法に関するものである。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 PCR法は、目的とするDNA領域（標的配列）を挟む2種のプライマーを用いてDNAポリメラーゼによる錆型特異的なDNA合成反応をインピトロでくり返すことによって、特定のDNA断片を短時間で数十万倍に及ぶ数に増幅する方法である。現在行われているPCR法は、標的配列を含む2本鎖DNAを1本鎖に分離（変性）する第1段、分離した1本鎖に正方向および逆方向のプライマーを結合（アニーリング）させる第2段、および結合したプライマー標的配列に相補的な塩基をDNAポリメラーゼの作用により順に結合（伸長）する第3段からなっている。標準的なPCR法では、DNA試料、緩衝液、20塩基程度のプライマー2種およびポリメラーゼを含む反応系を、DNAサーマルサイクラーを用いて、94°C 20秒間（第1段：変性）、55°C 20秒間（第2段：アニーリング）および72°C、30秒間（第3段：伸長）の3段のサーモサイクルに30～35回程度さらすことにより行われる。この方法により増幅したD

NA断片を適当な手段により発色させると、僅かな数しか存在しなかったDNAまたはそのDNAを含む微生物の検出が可能となるので、この方法は、遺伝子工学、医学、農学、法医学等の分野で広く応用されつつある。

【0003】 この方法によってゲノムの少なくとも一部について配列が判明している微生物の存在を証明しようとする場合、検体中に微生物のみを含む単純な系では検出が成功するが、臨床検査検体（血液、尿、組織ホモジネート等）のような種々複雑なDNAが共存する系では、多数のバンドによる広範な発色が見られ、検出困難となることがわかった。

【0004】

【課題を解決するための手段】 この発明者は、上記の困難を克服しようとして種々の検討を重ねた結果、プライマーとして従来の約2倍程度の長いものを用い、アニーリング温度を従来より高くして伸長反応の温度と同程度にし、それによってアニーリングと伸長反応を同時にを行うようになると、臨床検査検体のような系でも微生物のDNAを特異的に検出できることを見出し、この発明を完成したのである。

【0005】 すなわち、この発明は、第1段として、標的配列含有2本鎖DNAを含む試料中の上記DNAの変性反応を、PCR法においてDNAの変性に通常用いられる温度で行い、第2段として、それぞれ35塩基以上の長さをもつ正方向および逆方向プライマー、4種の塩基dGTP、dTATP、dTTP、dCTPおよびDNAポリメラーゼの存在下に、上記標的配列を含む変性DNAに対する両プライマーのアニーリング反応とDNAポリメラーゼによるプライマー鎖の伸長反応を、PCR法においてプライマー鎖の伸長反応に通常用いられる温

30

40

50

3

度で行うことと特徴とする、2段サーモサイクルPCR法、および上記方法を実施し、増幅生成物を検索することと特徴とする核酸検出法を提供するものである。

【0006】従来、プライマーの鎖長は広く見積もっても15~30塩基と考えられていたが、これは、鎖長がそれより短いとポリメラーゼによる伸長反応の温度で錆型とアニーリングしなくなること、および必要以上に長くすると却てミスアニールの確率が高くなると考えられていたからである（共立出版株式会社発行、「遺伝子増幅PCR法—基礎と新しい展開」第207頁左欄末行～右欄3行）。すなわち、長鎖のプライマーでは特異性が低くなると考えられていたにもかかわらず、この発明において長鎖のプライマーを使用することにより、標準的なプライマーでは検出不可能なDNAが検出可能になる程高い特異性が得られることは、意外なことである。

【0007】

【実施態様】この発明の方法は、まず、第1段として、標的配列含有2本鎖DNAを含む試料中の上記DNAの変性反応を、緩衝液のような媒体中において、PCR法においてDNAの変性に通常用いられる温度で行うことにより実施される。標的配列とは、増幅を意図する配列を意味する。このような配列は、原核生物のDNAおよび真核生物の核内もしくは核外DNAの一部分または合成核酸であり得、ウイルス、リケッチア、細菌、真菌、藻類、高等植物、原虫、下等動物、軟体動物、節足動物、脊椎動物から、または合成により得られる。2本鎖DNAとは、互いに完全または実質的に相補的な一対のDNAを意味し、これは通常相補的な塩基間の結合によりアニーリングしている。試料とは、2本鎖DNAを含む限り任意のものであり得る。代表的なものは、臨床検査検体、例えば血液およびそれに由来するフラクション、リンパ液、髓液、唾液、喀痰、器官または組織、毛髪、精液、尿、その他の身体由来物、および細胞培養物、汚染の疑がある物品の洗浄液等である。DNAの変性に通常用いられる温度とは、2本鎖DNAを1本鎖DNAに解離させるに足る温度であり、通常90~95°C程度である。この発明の反応は、通常温度と時間のプログラム入力が可能な自動増幅装置を用いて行われるので、上記第1段の反応を行う際には、反応液にDNA試料以外に第2段で用いるプライマー、塩基、DNAポリメラーゼ等も加えておくのが普通である。反応時間は20秒以上が好ましい。

【0008】第2段は、第1段から得た変性DNA、2種のプライマー、4種の塩基およびDNAポリメラーゼ存在下、アニーリング反応と伸長反応を、PCR法においてプライマー鎖の伸長反応に通常用いられる温度で行うことにより実施される。この発明の方法で使用する2種（正方向および逆方向）のプライマーは、35塩基以上の鎖長をもつものであり、通常45塩基以下、好ましくは40±3または40±2、特に40塩基鎖長をも

つ。プライマーは、標的配列を挟む以外に、次のような条件をできるだけ保有することが望ましい。（1）塩基がランダムに配列する、（2）GC含量は増幅部分と同程度または50%内外である、（3）3'末端で2次構造をとらない、（4）2つのプライマーが互いに相補的でない、（5）他の領域とのホモロジーが低い。プライマーは5'末端のラベル（FITC：フルオレスセインイソチオシアナート、ビオチン等）、DMTr（ジメトキシトリチル）等が結合していてもよい。また、プライマーは少数（1、2個）の非相補塩基を含んでいてもよい。このようなプライマーは、例えばDNA自動合成機を用いて合成することができる。自動合成機は通常固相シアノエチルホスホアミダイト法に基づくもので、固相担体としてCPG（コントロールポアグラス）が広く用いられる。固相担体に、3'末端に相当する塩基をエステル結合させ、その5'保護基（例えばDMTr）を酸で除去して次の塩基を結合させる。合成したフラグメントはアンモニアで担体から切り離す。精製は、例えば逆相HPLCによる。塩基dNTPは、dGTP、dTTP、dATP、dTTPおよびdCTPを含む。DNAポリメラーゼとしては、耐熱性のものが好ましく、例えばファルマシア社から販売されているTthDNAポリメラーゼや、バーキン・エルマー・シータス社、ストラタジーン社、ニュー・イングランド・バイオラブス社等から販売されているTaqDNAポリメラーゼ[テルムス・アクアチクス(Thermus aquaticus)から得たものまたはこれを大腸菌で発現させたもの]が適当である。そのほか、反応液には通常PCR反応に用いられる種々の成分を含ませることができる。例えば、マグネシウムイオンはポリメラーゼの活性およびプライマーのアニーリングを促進する。塩化カリウムもポリメラーゼ活性を促進するが、高濃度では阻害的に作用する。そのほか、DMSO、ゼラチン、BSA、非イオン界面活性剤が加えられる場合もある。

【0009】鎖の伸長反応に通常用いられる温度とは、DNAポリメラーゼによる塩基配列伸長反応が行われる温度であるが、この発明の方法ではDNAに対するプライマーのアニーリングもこの温度で行われる。このような温度は通常70~80°Cであり、70~75°C、特に約72°Cが好ましい。この発明の方法ではアニーリングと伸長が同時に行われるので、アニーリングのための時間を考慮する必要がなく、第2段は通常の伸長時間すなわち約30秒以上が適当である。サイクル数は特に制限されないが、30~35サイクルが適当である。

【0010】上記第1段および第2段を含むこの発明の方法は、通常、例えば自動増幅装置を用いて、例えば緩衝液のような適当な媒質中で錆型DNA、各塩基、プライマーおよびDNAポリメラーゼを温度変換サイクルにかける等の方法により行なうことができる。好ましい実施方法の一例を示すと次の通りである。

(1) 0.5 mlの遠心管に下記組成の反応液を入れる。好ましくは、ミネラル・オイル(例えばシグマ社M-3516)で覆う。

(組成) 鑄型DNAを含む試料

0.3~0.5 μMの順方向プライマー

0.3~0.5 μMの逆方向プライマー

1.0 mMトリス・HCl(pH 8.3)

5.0 mM KCl

1.5 mM MgCl₂

0.001%ゼラチン

2.5~25.0 μMの各dNTP

1.25~2.5単位DNAポリメラーゼ

上記組成は適宜変更することができる。例えばマグネシウム濃度はdNTPの全濃度を0.5~2.5 mM超える濃度が好ましい。dNTP濃度は高すぎるとDNAポリメラーゼが誤ったdNTPをとり込む可能性が増加する。DNAポリメラーゼが高すぎると非特異的な産物が増えるが、低すぎると産物の収率が低下する。

(2) 自動増幅装置に反応液をセットし、1:熱変性、2:アニーリングおよび伸長からなるサイクルを20サイクル以上、好ましくは30サイクル以上行なう。自動増幅装置は、例えばパーキン・エルマー・シータス社から販売されている。

【0011】增幅生産物は、2種のプライマーにはさまれた塩基配列およびそのアンチセンス鎖であり、これらは例えばアガロースゲル電気泳動のような分離手段により分離される。また、生産物はマーカーとの比較によるバンドの長さにより検出されるが、さらに標識プローブを用いるサザンハイブリダイゼーションにより確認することができる。標識としては、³²P、ビオチン、ジゴキシゲニン等が用いられる。これらを用いる実験方法は文献に記載されている。增幅生産物の存在は、標的配列の存在を示し、したがって標的配列が由来する細胞または*

(SA: スタフイロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*))

[配列番号:1] 5'-ATTCTGTCGTCCGTCCCTCATGCCATGTGCAACAATGATA -3'

[配列番号:2] 5'-GGCGATTTAGGTGTGATCATGGCAAAGTATTGATACCCG -3'

[配列番号:3] 5'-GGTTGGCCTAATATTGTTCGTCAAACCGCTGGGTATCA -3'

[配列番号:4] 5'-GGCAGTTACTTTAGGTACATCTGCAAGATTCGATCCGTGG -3'

[配列番号:5] 5'-GGATTGTCGCAAACACCAGACAAAAGGATAGCCCGAAA -3'

[配列番号:6] 5'-CATCTCTATGCAATTCAAAGGCCCTTAACAAAGGCATTC -3'

(SE: スタフイロコッカス・エピデルミディス(*St. epidermidis*))

[配列番号:7] 5'-TCATGGTCAAATCGGATGGATGAGGCCACGGCTTCTGGT -3'

[配列番号:8] 5'-GATCACGGTGGCGTAATTGAGGTACAGATGGCTTTCCGA -3'

[配列番号:9] 5'-TTAGAAAGCGGACCCATTGGGGTTTGACACATCTGTAC -3'

[配列番号:10] 5'-GACCTTGACCTACTAATGCAACAATTCTGCACCAACCCCT -3'

[配列番号:11] 5'-AGTGGTATTAGCGATGGGTATTGAGCCCCCTGTTGTTCTG -3'

[配列番号:12] 5'-CTCGAGGCATCAAATGATACAACCTATCAGCAGTAGTGG -3'

また、比較のため、下記20塩基プライマーを合成した。

【化3】 (SA: スタフイロコッカス・アウレウス(*Sta*

*微生物存在の指標となる。上記の方法を実施するには、実施に必要な試剤および器具をまとめてキットにしておくのが便利である。このようなキットは、下記の中から選ばれたものを含むことができる。(1)順方向プライマー、(2)逆方向プライマー、(3)緩衝液、(4)KCl、(5)MgCl₂、(6)ゼラチン、(7)4種類のdNTP、(8)DNAポリメラーゼ、(9)ミネラル・オイル、(10)遠心管、(11)発色試薬(例えばエチジウムプロミド)等。

【0012】

【効果】この発明のPCR法は、2段サーモサイクルで行われるので、3段サーモサイクルで行う従来法に較べて簡単であり、短時間で完了する。また、プライマーが長いことと、アニーリング温度が高いことにより、汚染DNAの増幅がなく、特異性が向上する。その結果、従来のプライマーでは非特異的生成物が多く検出不可能であった微生物も検出することが可能となった。このように、この発明の方法は従来法に比較してすぐれたものであり、大きな利点をもたらすものである。

【0013】

【実施例】以下、この発明を実施例により説明するが、実施例はこの発明を制限するものではない。

〔スタフイロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)およびスタフイロコッカス・エピデルミディス(*St. epidermidis*)の検出〕

実施例1(プライマーの合成)

アプライド・バイオシステムズ・ジャパン株式会社製モデル392 DNA/RNAシンセサイザーを使用し、同社のオペレーターズマニュアルに従って塩基の結合と脱保護を行い、この発明で使用する下記プライマーを合成した。

【化2】

phylococcus aureus))

[配列番号:13] 5'-TGCCCATGTGCAACAATGATA -3'

[配列番号:14] 5'-GGCAAAGTATTGATACCCG -3'

[配列番号:15] 5'- GTCAAAGCGCTGGGTATCA -3'
[配列番号:16] 5'- CTGCAAGATTGCATCCGTGG -3'
[配列番号:17] 5'- GACAAAAGGATAACCCCGAAA -3'
[配列番号:18] 5'- GCGGCTTAACAAAGGCATTC -3'
(S E : スタフィロコッカス・エビデルミディス(St. epidermidis))

[配列番号:19] 5'- ATGAGGCCACGGCTTCTGGT -3'

[配列番号:20] 5'- CGTACAGATGGCTTTTCA -3'

[配列番号:21] 5'- GCGGTTTGACACATCTGTAC -3'

[配列番号:22] 5'- AACAAATTCTGCACACCCCT -3'

[配列番号:23] 5'- TTGCAGCCCCCTGTTGTTCTG -3'

[配列番号:24] 5'- AACTCTATCAGCAGTAGTGG -3'

なお、20塩基プライマー(配列番号:13~24)は、対応する40塩基プライマー(配列番号1~12)の後半部分と全く同一である。通常正方向プライマーの5'末端をビオチン-O-N-ホスホルアミダイドでラベルし、逆方向プライマーの5'末端をアミノリンカーI I (A B I社)でリンカーのついた状態にして、下記方法にしたがいジゴキシゲニンでラベルした。

【0014】ジゴキシゲニンラベル法：リンカーのついたプライマーをエタノールで沈殿させ、ほう酸ナトリウムをpH9.5の緩衝液50μlで溶かす。ジゴキシゲニン-NHS-エステルを1.3mg/50μlになるようジメチルホルムアミドで溶かし、上記プライマー溶液に加え、VolteX処理して暗所中室温で一夜反応させる。NAP-10でゲル交換後濃縮し、HPLC(μBondapac C₁₈、Waters社、商標)で分離し、再濃縮する。

(錆型DNAの抽出と精製)臨床菌株としてスタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、スタフィロコッカス・エビデルミディス(Staphylococcus epidermidis)、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)およびクレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)等の各菌株をBHI(Brain Heart Infusion)培地で一晩培養し、培養菌株を遠心等によって集菌し、基本的には、サイトウミウラ法バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・アクタ(Biochem.Biophys.Acta)、72巻、619~629頁(1963年)に従ってゲノムDNAを抽出する。ただし、この方法では、エシェリキア・コリ(E.coli)、クレブシエラ・ニューモニエ(klebsiella pneumoniae)等のグラム陰性菌をベースにした溶菌酵素として、リゾチーム(Sigma社、商標)を用いているが、リゾチーム耐性菌に対しては、必要に応じリゾスタフィン(Sigma社、商標)、アクロモベプチダーゼ(和光純薬、商標)、N-アセチルムラミダーゼ(生化学工業)等に加え、使い分け、溶菌させてからフェノール処理を行う。

【0015】(PCR反応)PCR混合液としては、10mMトリス・HC1(pH8.3)、50mM KCl: 1.5mM MgCl₂; 0.001%(w/v)ゼラチン; 2.5単位のTaq DNAポリメラーゼまたはTth DN

Aポリメラーゼ; 200 μMずつのd NTP類: 0.3 μMのプライマー類および適当な錆型DNA約1μgを含ませ全量を100μlとした。PCR温度条件は、2段サーモサイクルの場合、94°Cで15秒間変性させた後、72°Cでアニーリングおよび伸長反応を行い、30サイクル繰り返した。すべての反応は、DNAサーマル・サイクラー(バーキン-エルマー・シータス)で行い最初の変成および最後の伸長はそれぞれ5分および7分を行った。また、対照の3段サーモサイクルの温度条件は、94°Cで1分間変性し、58°Cで1分間アニーリングを行い、72°Cで2分間伸長反応をさせた。これを30サイクル繰り返した。PCR産物を3:1ヌシーブ/シーケム(Nusieve/Seakem)アガロース(FMCバイオプロダクト社)により電気泳動を行った。

【0016】(プレートアッセイ)10 μg/mlのストレプトアビシン(ベゼスター・リサーチ・ラボラトリー社)を

100 μl/ウェルの割合で96穴プレートに入れ、4°Cで一晩放置する。洗浄緩衝液(100mM トリス・HC1(pH7.4)、150mM NaCl、1mM EDTA、0.1%ツイン20)300 μlで1回洗浄する。次に、ブロックエース(雪印)を300 μl/ウェル加え、室温で2時間または4°Cで一晩放置する。上記洗浄緩衝液300 μlで1回洗浄した。続いて、洗浄緩衝液で2000倍に希釈したアンチジゴキシゲニンペルオキシダーゼ(ベーリンガー・マンハイム-山之内社)を90 μl、PCR産物を10 μlをウェルに入れ(全量100 μl)、室温で30分放置する。そして洗浄緩衝液300 μlで3回洗浄し、オーフェニレンジアミン/H₂O₂で発色させる。

【0017】実施例2

実施例1記載のSA:スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)およびSE:スタフィロコッカス・エビデルミディス(St. epidermidis)、を用いて、以下の実験を行った。

a) 20塩基プライマー【配列番号:15~24】を用い、3段サイクルPCR法(従来法)を行った。結果を図1に示す。両端は分子量マーカー、Nは陰性対照、Pは標的DNA含有試料、HはヒトDNAである。

b) 20塩基プライマー【配列番号:15~24】を用い、2階サイクルPCR法(比較例)を行った。結果を図2に示す。試料中のDNAは検出されないことがわかる。

c) 40塩基プライマー【配列番号:3、4】および20塩基プライマー【配列番号:15、16】を用い、c-h-DNAスクリーニングの2段サイクルPCR法を比較した。結果を図3に示す。左側が20塩基、右側が40塩基の場合である。両端は分子量マーカー、Nは陰性対照、SA、SE、EC、KPはそれぞれスタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、スタフィロコッカス・エビデルミディス(Staphylococcus epid-

9

ermidis)、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)、クレブシエラ・ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*)の鑄型DNAを示す。標的DNA(SA)は40塩基では検出されるが20塩基では検出されないことがわかる。

d) 40塩基プライマー【配列番号：5、6】および20塩基プライマー【配列番号：17、18】を用い、ch-DNAスクリーニングの2段サイクルPCR法を比較した。結果を図4に示す。標的DNA(SA)は40塩基では検出されるが20塩基では検出されないことがわかる。

【0018】実施例3

40塩基プライマー【配列番号：1、2、9、10】および27種の菌およびヒトのDNAを鑄型として用い、2段サイクルPCR反応を行った。結果を図5、6、7および8に示す。左側が20塩基、右側が40塩基の場合である。標的DNA(SAまたはSE)が検出されることがわかる。

【0019】実施例4

40塩基プライマー【配列番号：3、4、7、8、9、10、11、12】およびSA、SE、EC、KN、Hu(ヒト)のDNAを鑄型として用い2段サイクルPCRを行った。結果を図9および図10に示す。それぞれ標的DNAが検出されることがわかる。

【0020】実施例5

40塩基プライマー【配列番号：1、2】および実施例3と同じ27菌種およびヒトの鑄型DNAを用いて2段サイクルPCRを行い、その産物をプレートアッセイにより調べた。結果を図11に示す。図11において、実験はデュプリケート(左右に並ぶ)で行い、左上から対照、バチルス・サブチリス(*B.subtilis*)、シトロバクター・アマロナティクス(*C.amalonaticus*)、シトロバクター・ジベルサス(*C.diversus*)、エシェリキア・コリ(*E.coli*)、エンテロバクター・アグロメランズ(*E.agglomerans*)、エンテロコッカス・デュランズ(*E.durans*)、エンテロコッカス・ファカリス(*E.faecalis*)、エンテロバクター・エスピー(*E.sp*)、ヘモフィリス・インフルエンザ(*H.influenzae*)、ヘモフィリス・パラインフルエンザ(*H.parainfluenzae*)、クレブシエラ・オキシトカ(*K.oxytoca*)、クレブシエラ・ニューモニエ(*K.pneumoniae*)、ミクロコッカス・ルテウス(*M.luteus*)、シュードモナス・アエルギノーザ(*P.aeruginosa*)、シュードモナス・アルカリジェネス(*P.alkaligenes*)、シュードモナス・フルオレッセンス(*P.fluorescens*)、セラチア・マルセッセンス(*S.marcescens*)、スタフィロコッカス・アウレウス(*S.aureus*)、スタフィロコッカス・エピデルミディス(*S.epidermidis*)、ストンプトロコッカス・ヒクス(*S.hicus*)、ストレプトロコッカス・ボビス(*S.bovis*)、ストレプトコッカス・ラクティス(*S.lactis*)、ストレプトコ*

配列

ATTCTGTCGT CCGTCCCTCA TGCCATGTGC AACAAATGATA

10

* ッカス・ミティス(*S.mititis*)、ストレプトコッカス・ビオゲネス(*S.pyogenes*)、ストレプトコッカス・サリバリウス(*S.salivarius*)、ストレプトコッカス・サンギス(*S.sanguis*)、エルシェニア・エンテロコリチカ(*Y.enterocolitica*)、ヒト鑄型DNAの順であり、発色しているのはスタフィロコッカス・アウレウス(*S.aureus*)のみである。したがって、標準DNAが検出されることがわかった。

【0021】実施例6

- 10 10 エシェリキア・コリ(*E.coli*)、クレブシエラ・ニューモネア(*Klebsiella pneumoniae*)、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・エピデルミディス(*S.epidermidis*)を培養し、集菌、洗浄後2mlのヒト正常血に 1×10^6 細胞/mlになるように加え、37°C、60分インキュベートした。M-PRM試薬(フロー・ラボラトリー社)1.5mlに反応血液1.75mlを重層し、2000 rpm、30分、室温で遠心分離後、定法に従いPMN(白色好中球: Polymorphonuclear Neutrophil)の画分を分取しPBSで洗浄後、再懸濁した。バクテリアル・ライシス・エンザイム(Bacterial Lysis Enzyme)【N-アセチルムラミダーゼSG(生化学)、リゾスタフィン(Sigma社)、リゾチーム(Sigma社)】等を1mgまたは1ml溶解した変性用緩衝液(50 mM KCl、10 mM Tris-HCl(pH 8.3)、2.5 mM MgCl₂、0.45% NP-40、0.1 mg/mlゼラチン、0.45%ツイン-20)250 μlを加えた。37°C、30分インキュベート後、プロテイナーゼK(メルク社)(1mg/ml)1.5 μlを加え、55°C、1時間反応させた。100°C、5分間で反応を止め、各サンプルから50 μlをとり、PCR(反応)に供した。
- 20 条件: 94°C、5分(94°C、15秒、75°C、30秒×30サイクル)72°C、7分。プライマー: 【配列番号: 1, 2, 9, 10】
- 30 結果を図12および図13に示す。それぞれ標的SAおよびSEのDNAが検出され、この結果からこの発明の方法ではヒトのゲノムDNA存在下でも標的DNAが検出できることがわかる。

【0022】

【配列表】

- 40 【0023】配列番号: 1
配列の長さ: 40
配列の型: 核酸
鎖の数: 1本鎖
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: 他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル: No
アンチセンス: No

11

12

【0024】配列番号：2

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

CCCGATTTAG GTGTGATCAT GCGCAAAGTA TTGATACCCG 40

【0025】配列番号：3

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

CGTGGCCTA ATATTGTTTC GTCAAAGCCC TCCGGTATCA 40

【0026】配列番号：4

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

GGCAGTTACT TTAGGTACAT CTGCAAGATT GCATCCGTGG 40

【0027】配列番号：5

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

CGATTTGTCG CAAACCACCA GACAAAAGGA TAGCCCGAAA 40

【0028】配列番号：6

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

CATCTCTATG CAATTCAAAG GCGGCTTAAC AAAGCCATTG 40

【0029】配列番号：7

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

◆トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

◆ アンチセンス：Yes

配列

TCATGGTGCA AATGGGATGG ATGAGGCCAC GCTTTCTGGT 40

【0030】配列番号：8

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

※40 アンチセンス：Yes

配列

GATCACGGTG CGGTAAATTGA GGTACAGATG GGCTTTTCGA 40

【0031】配列番号：9

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

★ アンチセンス：No

配列

TTAGAAAGCG GACCCATTG GGGTTTGAC ACATCTGTAC 40

【0032】配列番号：10

配列の長さ：40

配列の型：核酸

50 鎖の数：1本鎖

13

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAGCCTTGAC CTAGTAATGC AACAAATTCTT GCACCACCCCT 40

【0033】配列番号：11

配列の長さ：40
配列の型：核酸
鎖の数：1本鎖

配列

AGTGGTTATA GCGATGGGT TTGCAGCCCC TGTGTTCTG 40

【0034】配列番号：12

配列の長さ：40
配列の型：核酸
鎖の数：1本鎖

配列

CTCGAGGCAT CAAATGATA AACTCTATCA GCACTAGTGG 40

【0035】配列番号：13

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：1本鎖

配列

TGCCATGTGC AACAAATGATA

【0036】配列番号：14

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：1本鎖

配列

CCGCAAAGTA TTGATACCCG

【0037】配列番号：15

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：1本鎖

配列

GTCAAAGCCC TCGGGTATCA

【0038】配列番号：16

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：1本鎖

配列

CTCCAAGATT CCATCCCTGG

【0039】配列番号：17

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：1本鎖

配列

GACAAAAGGA TAGCCCCAAA

【0040】配列番号：18

配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：1本鎖

* ハイポセティカル：No
* アンチセンス：Yes

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル：No
※ アンチセンス：No

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル：No
★ アンチセンス：Yes

☆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル：No
☆20 アンチセンス：No

20

◆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル：No
◆ アンチセンス：Yes

20

* トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル：No
* アンチセンス：No

20

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル：No
※ アンチセンス：Yes

20

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル：No
★ アンチセンス：No

20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA
ハイポセティカル：No
50 アンチセンス：Yes

15

配列

CCGGCTTAAC AAAGCCATTG

【0041】配列番号：19

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

ATGAGGCCAC CCTTTCTCGT

【0042】配列番号：20

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

CGTACAGATG GGCTTTTCGA

【0043】配列番号：21

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

CGGGTTTGAC ACATCTGTAC

【0044】配列番号：22

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

AACAAATTCT GCACCACCT

【0045】配列番号：23

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

TTGCACCCCCC TGTGTTCTG

【0046】配列番号：24

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列

AACTCTATCA GCAGTAGTGG

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2において20塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

【図2】実施例2において40塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

【図3】実施例2において40塩基プライマーおよび20塩基プライマーを用いて比較した電気泳動の写真である。

【図4】実施例2において別の40塩基プライマーおよび20塩基プライマーを用いて比較した電気泳動の写真である。

20

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

* アンチセンス：No

20

※ トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

※ アンチセンス：Yes

20

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

★ アンチセンス：No

20

☆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

☆ アンチセンス：Yes

20

◆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

◆ 30 アンチセンス：No

20

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイポセティカル：No

* アンチセンス：Yes

20

40 【図5】実施例3において種々の鋳型と40塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

【図6】実施例3において種々の鋳型と40塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

【図7】実施例3において種々の鋳型と別の40塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

【図8】実施例3において種々の鋳型と40塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

【図9】実施例4において種々の鋳型と40塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

【図10】実施例4において種々の鋳型と40塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

17

【図11】実施例5のプレートアッセイの結果を示す図である。

【図12】実施例6において種々の鋳型と40塩基プラ *

* イマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

【図13】実施例6において種々の鋳型と40塩基プライマーを用いた場合の電気泳動の写真である。

[圖 1]

【図2】

プライマー：配列番号



プライマー：配列番号

3. 21

| 22

20

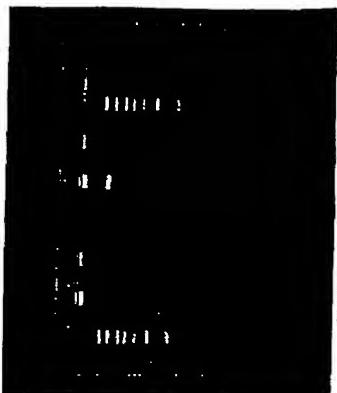
18

13

[图3]

【図4】

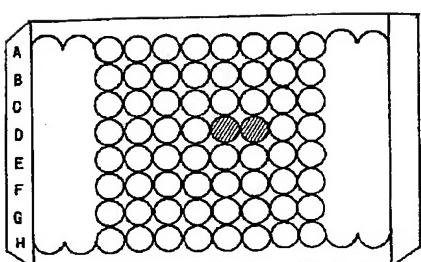
NSA SEE CKP
NSA SEE CKP
NSA SEE CKP



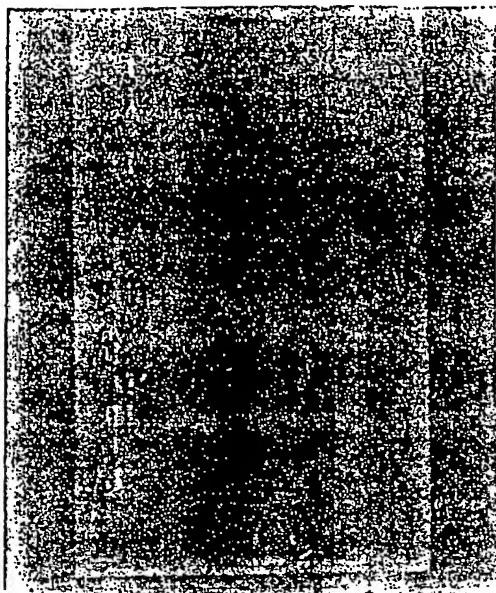
M.W
NSA SEE CP NSA SEE CP
プライマー：
配列番号 5. 6

プライマー：
配列番号 17. 18

[図11]



【図5】



M.W.
P.aeruginosa
M.luteus
K.pneumonie
K.oxytoca
H.parainfluenzae
H.influenzae
E.sp
E.faecalis
E.durans
E.agglomerans
E.coli
C.diversus
C.camalonaticus
B.subtilis
NONE
M.W.

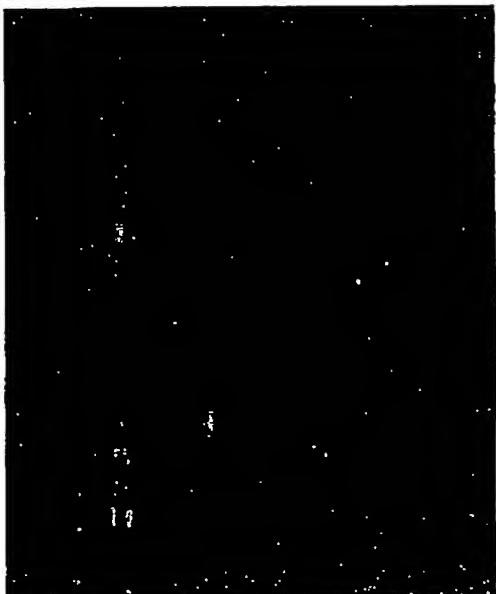
【図9】



M.W., N, SA, SE, EC, KN, Hu, N, SA, SE, EC, KN, Hu, M.W.
プライマー：
配列番号 3, 4 配列番号 7, 8

プライマー：配列番号 1, 2

【図6】



M.W.
Human ch-DNA
Y.enterocolitica
S.sanguis
S.salivarius
S.pyogenes
S.milis
S.lactis
S.bovis
S.hygicus
S.epidermidis
S.aureus
S.marcescens
P.fluorescens
P.alkaligenes
M.W.

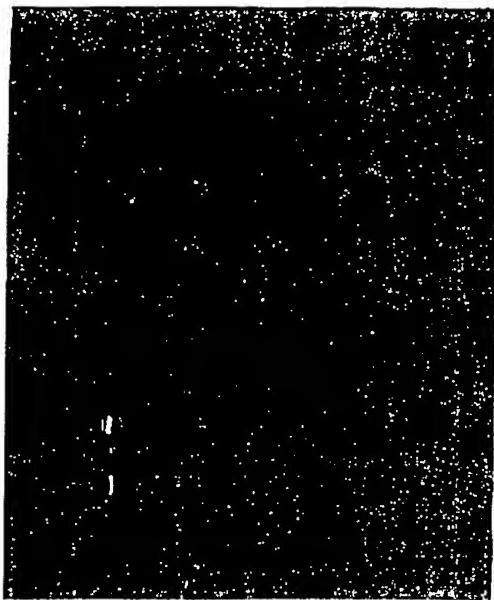
【図10】



M.W., N, SA, SE, EC, KN, Hu, N, SA, SE, EC, KN, Hu, M.W.
プライマー：
配列番号 9, 10 配列番号 11, 12

プライマー：配列番号 1, 2

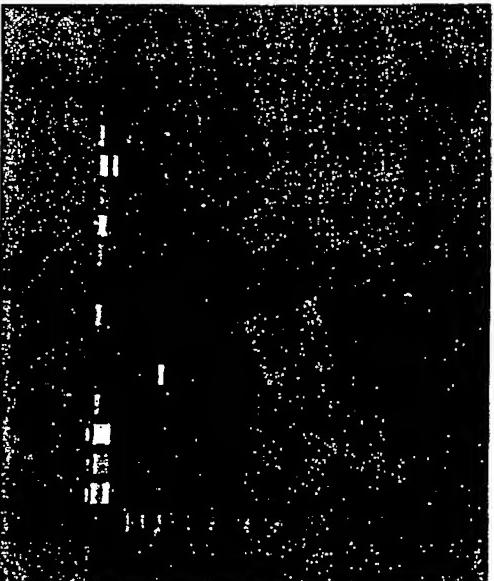
【図7】



M.W.
P.aeruginosa
M.luteus
K.pneumonie
K oxytoca
H.parainfluenzae
H influenzae
E.sp
E faecalis
E durans
E agglomerans
E coli
C diversus
C amalonaticus
S subtilis
NONE
M.W.

プライマー：配列番号 9, 10

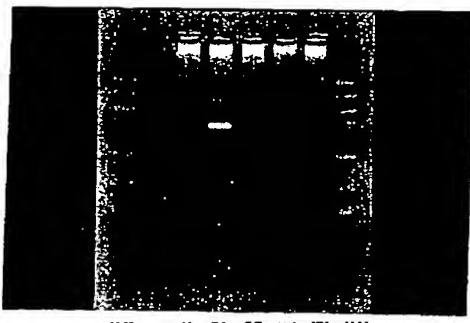
【図8】



M.W.
Human ch-DNA
Y enterocolitica
S sanguis
S salivarius
S pyogenes
S mitis
S lactis
S bovis
S hyicus
S epidermidis
S aureus
S marcescens
P fluorescens
P alkaligenes
M.W.

プライマー：配列番号 9, 10

【図12】



プライマー：配列番号 1, 2

【図13】



プライマー：配列番号 9, 10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)